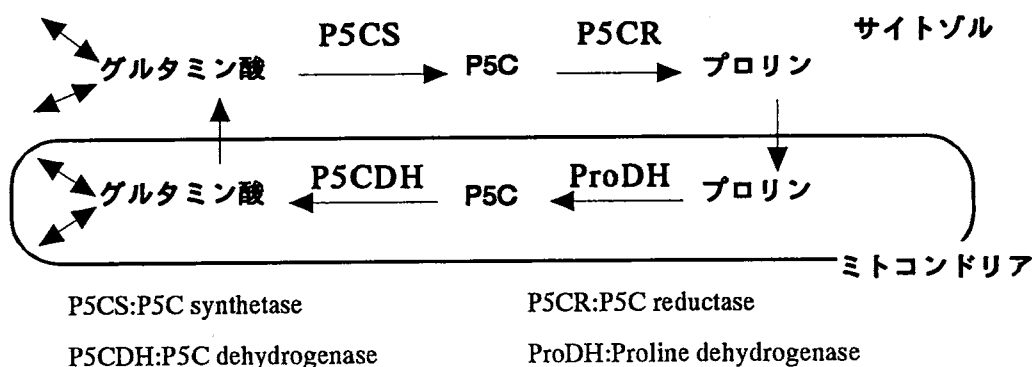


氏 名	林 史 夫
生 年 月 日	
本 籍	愛知県
学 位 の 種 類	博士 (理学)
学 位 記 番 号	博甲第362号
学位授与の日付	平成12年3月31日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	The role of proline as an osmolyte in stressed plants-Dynamics of biosynthesis and degradation (ストレス植物における浸透圧調節物質としてのプロリンの役割 - 合成と分解のダイナミクス)
論文審査委員(主査)	和田敬四郎 (自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	山口 和男 (遺伝子実験施設・教授) 櫻井 勝 (理学部・教授) 福森 義宏 (理学部・教授) 星名 哲 (理学部・助教授)

学 位 論 文 要 旨

Proline accumulated in plants exposed to hyperosmotic stresses plays a role as an osmolyte. A decrease of proline content in darkness was observed in the leaves or shoots of *Mesembryanthemum crystallinum* L., barley, wheat and *Arabidopsis* under salt stress conditions. Interestingly, proline content in *Arabidopsis* was fluctuated under unstressed conditions as well as stressed conditions. The fluctuation of proline level seems to be regulated by transcription levels of P5CS and ProDH. Compared these results with those of glycinebetaine which is the most suitable osmolyte, it is proposed that proline accumulation responds to a subtle change of cellular water status and sustains the osmotic balance between cells and outer environment, and that, moreover, protects plants from an excessive loss of water and a certain trouble caused by decrease in insignificant level of water content. Therefore, proline is defined as "sensitive and emergent osmolyte" to evacuate plants from the water deficit. On the other hand, two P5CR isoforms, P5CR-1 and P5CR-2, were firstly purified from spinach leaves. P5CR-2 was located in chloroplast. This is notable for proline biosynthesis pathway because of implying proline biosynthesis in chloroplast.

【背景】 現在地球上広範囲で進行している地球の砂漠化や、将来予想される食糧不足は人類が抱える重大な問題の一つである。塩・乾燥耐性能（高浸透圧耐性能）を賦与した形質転換植物は、これら問題に対する有効な解決策として期待できる。我々はいくつかの乾燥耐性機構の中で「プロリンの蓄積による耐乾性能の向上」に着目した。なぜなら、プロリンは乾燥耐性能の向上だけでなく、エネルギー源としての寄与も唱われており、非常に有用な物質だからである。そして、プロリンは下図のように代謝される事も近年明らかになってきた。



このようにプロリンの代謝系は閉鎖系であり四種の酵素により制御されている。つまりこれら酵素の遺伝子発現レベル、タンパク質レベルでの解析がプロリン代謝の全貌を明らかにすると考えられる。近年の分子生物学的手法によりこれらタンパク質の遺伝子レベルでの解明は進展したが、タンパク質レベル、実際の機能の発現についての解明は遅れている。また、有効な浸透圧調節物質として知られているグリシンベタインとプロリンは化学的に多くの共通点を持つと同時に、プロリンは容易に分解される等の固有の特徴を有する。それ故、同じ浸透圧調節物質であるが、グリシンベタインとプロリンとの間に機能の違いが考えられる。これら問題に対する解答を得るために、私は何種かの植物におけるプロリン蓄積量の変動を詳細に調べると共に、プロリンの生合成・分解に関与する酵素の精製、酵素学的特性の解明に取り組んだ。

【暗期におけるプロリンの分解】 高浸透圧ストレスにより植物体内に蓄積されたプロリンはそのストレス下では減少することはないと、考えられてきた。しかしながら、12時間明期、12時間暗期の光条件下で栽培されたオオムギ、コムギ、*Mesembryanthemum crystallinum* L.、アラビドプシスの葉もしくは地上部においてストレス下でも暗期にプロリンが減少することが明らかになった。この暗期におけるプロリン量の減少はストレス開始後、数日間観察された。また、興味深いことに、比較的低湿度の環境（相対湿度35-45%）で栽培されたアラビドプシス地上部では非ストレス下でも暗期にプロリンの減少が観察された。このようにプロリン量の暗期での減少、明期での増加はある条件下において容易に起こることを明らかにした。また、この暗期におけるプロリンの減少は浸透圧ストレスの緩和に呼応した分解の結果である

ことが示され、ProDHの関与が示唆された。

【P5CS及びProDHのmRNA量、タンパク質蓄積量の変動】 アラビドプシスに見られた暗期におけるプロリン量の減少に対し、P5CS遺伝子発現量・タンパク質蓄積量の減少とProDH遺伝子発現量・タンパク質蓄積量の増加が関与することを示した。このようにプロリンの暗期での減少と明期での増加はP5CS及びProDH遺伝子の発現量とそれらタンパク質の蓄積量の変動と深く関わっていた。

【遺伝子発現量の変動を招く要因は何か？】 P5CS及びProDHのmRNA量が明暗で変動することとはそれら発現の制御因子の一つとして光が考えられる。しかしながら、高浸透圧ストレスを受けた植物においてストレス開始後の早い時期の急激なP5CS遺伝子の発現、ストレス開始後4、5日以降の暗期におけるプロリン量減少の消失、同時にP5CS遺伝子発現量の暗期での増加、ProDH遺伝子発現量の暗期での減少などは、光を制御因子として考えたとき説明できない。そこで、植物体内のわずかな含水量の変化がP5CS、ProDH遺伝子発現のための制御因子ではないかと考えた。実際、非ストレス下においてアラビドプシスの相対含水量は昼夜で5%程度変動した。その植物がストレス下に置かれると、相対含水量は昼夜の変動を伴いながら徐々に低下していく。ストレス開始後4、5日以降になると相対含水量の昼夜の変動は観察されなくなった。このように植物体内の含水量の変化とプロリン蓄積量の変化は相関関係が非常に高かった。このように植物内の水分状態の変動がP5CS及びProDHの遺伝子発現量に影響すると考えると、非ストレス下での、またストレス初期での昼夜における発現量の変動が説明できる。昼間の光合成による水の大量消費からくる水ポテンシャルの低下、また夜間におけるそれらの緩和にもよく応答していた。

【浸透圧調節物質としてプロリンとグリシンベタインの違い】 プロリンは細胞内の含水量の変化に伴って蓄積する。しかし、グリシンベタインも細胞内の含水量の低下に伴い蓄積量の増大が起きる。では浸透圧調節物質としてプロリンとグリシンベタインの差は何であろうか。それを知るために今回の研究により得られた結果と、グリシンベタインに関するこれまでの知見を五つにまとめた。第一にストレス下における暗期のプロリン量の減少はストレス初期にしか観察できない。第二にプロリン量の昼夜の変動は非ストレス下でも観察可能であり、それが遺伝子発現量の変動を伴うことより、プロリン量の増減は一般的な現象であると言える。第三にプロリン量の変動は植物の水分状態のわずかな変動に関係がある。第四にプロリンはグリシンベタインよりも早い時期に蓄積が起こる。最後に、常に高塩環境下で生育している塩性植物はグリシンベタインを蓄積しプロリンを蓄積する例はない。

【浸透圧調節物質としてのプロリンの役割】 上に述べた理由から、プロリンはわずかな植物内の水分の損失により生じる浸透圧変化に迅速に対応できる浸透圧調節物質と結論した。そして、プロリンの蓄積はそれ以上の水分の放出を防いだり、わずかな浸透圧バランスの変化によって生じる悪影響から植物体を保護していると考えられた。よってプロリンを「高感度かつ緊急避難的浸透圧調節物質」と定義した。

【P5CS及びProDHの酵素活性】 プロリン量の変動を支持するためにP5CS及びProDHの酵素活性の変動を確認することは最も重要なことである。基質として [U- ^{14}C] glutamic acid、[U- ^{14}C] prolineを用いたがそれらの酵素活性の検出には至らなかった。両酵素について、酵素の精製はされておらず、また生化学的知見は乏しい。数少ない知見から、活性が検出されない理由を考えた。P5CSの場合、リコンビナントP5CSは活性を示すが、植物粗抽出液との混合により活性が現れなくなるという報告がある。また、本研究では植物体内には定常的にP5CSタンパク質が存在することを抗体により確認した。これらの事実より、P5CSは何らかの物質により活性調節（阻害）を受けていると予想される。ProDHの場合、1990年にRayapati らが単離ミトコンドリアから活性を検出したのを最後にその後誰も活性の検出に成功していない。彼らもその後の精製過程で活性を見失っている。また、本研究において植物体内には定常的にProDHタンパク質が存在することも抗体により確認した。これら事実よりProDHは何らかのミトコンドリア成分と相互作用して活性を示すことが予想された。

【オオムギProDHとリコンビナントアラビドプシスProDH】 ProDHの生化学的、酵素学的特性の解明を行うため、オオムギ葉から抗体によりProDHの存在を確認しながら部分精製を行った。様々な検出手段が用いられたがProDHの酵素活性は検出されなかった。また、ProDHタンパク質の別の解析手段として、大腸菌大量発現系によりアラビドプシスProDH遺伝子産物を得た。この遺伝子産物からもProDH活性は検出されなかった。これら結果からも活性出現のためには何らかの成分との相互作用の必要性が示唆された。

【P5CRアイソエンザイム(P5CR-1、P5CR-2)の精製とP5CR-2の葉緑体局在性】 二種類のP5CRアイソエンザイムの精製に成功し、そのうち一方(P5CR-2)は葉緑体に局在することを明らかにし、葉緑体中でのプロリン合成の可能性を示した。この事実はこれまで考えられていたプロリン生合成系に新たな一石を投ずるものである。P5CRの基質としてP5Cの供給を考えた時、P5CSが葉緑体に局在するのか、もしくは、包膜中にP5C輸送体が存在するのか、という疑問が生じる。また、合成されたプロリンの葉緑体中での働きは何か、葉緑体で合成されたプロリンがミトコンドリアで分解されるなら包膜上にプロリン輸送体は存在するのか、という疑問

も生じる。また、現在、P5CRをコードする遺伝子は一種類しか単離されておらず、葉緑体への輸送シグナルを有する別の遺伝子の存在を示唆した。このようにP5CRの葉緑体局在性はいくつかの解決すべき新たな問題を提唱した。

学位論文審査結果の要旨

植物の環境ストレス応答に関する研究は、ストレス受容からシグナル伝達、遺伝子発現そして応答現象までいくつかのレベルがある。塩・乾燥ストレスに応答した適合溶質の蓄積についての遺伝子レベルでの説明が進んでいる。

植物の塩・乾燥ストレスに関する応答の一つとしてプロリンの蓄積は古くから研究されていたが、本論文は、ストレス時のプロリン蓄積とストレス解除時に起こるプロリンの代謝分解のメカニズムを(1)遺伝子発現(mRNAレベル)(2)酵素タンパク質の発現(3)活性の出現(4)プロリン量の増減の4つのレベルから説明しようとしたものである。ストレスと同時に合成系のキー酵素であるP5CS(Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase)の発現とプロリン蓄積が起こり、またストレス解除時にP5CSの発現抑制と同時に分解系のキー酵素であるProDH(Proline Dehydrogenase)の発現が誘導され、プロリンは減少に転ずる。このようなプロリンの増減の4つのレベルのつながりをArabidopsisを用いて明らかにしようとした。その結果、2つのキー酵素の活性の直接測定には成功しなかったが、遺伝子発現(mRNAレベル)、酵素タンパク質レベルそしてプロリン・レベルで対応していることを明らかにした。また、プロリンの増減は、ストレス時でなくとも、明暗による植物体内の水ポテンシャルの僅かな変動にも応答して起こることが観察された。このことからプロリンの蓄積・分解は植物細胞内の微妙な水分変化に応じた応答であり、他の適合溶質、例えばGlycinebetaineやPolyol、とは異なった機能を担っていることが明らかとなった。さらに酵素タンパク質レベルとプロリン・レベルは、全ての条件下で対応しているのではなく、酵素の活性レベルを制御する未知の因子の存在を示唆した。

これらの成果は分子生物学からの植物の生理現象の解釈に大きな意義を与えるものであり、本論文は博士(理学)論文に値するものと判断される。